

**京都大学教育研究振興財団助成事業  
成 果 報 告 書**

平成30年4月13日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団  
会 長 辻 井 昭 雄 様

所属部局: 工学研究科都市環境工学専攻

職 名: 助 教

氏 名: 五 味 良 太

助 成 の 種 類	<b>平成 29 年度 ・ 研究活動推進助成</b>			
申請時の科研費 研究 課 題 名	全ゲノム解析による下水処理水および病院排水中の薬剤耐性腸内細菌科細菌の実態解明			
上記以外で助成金 を 充 当 した 研 究 内 容	河川底泥における微生物の生息可能な微細構造を同定する研究			
助成金充当に関 わる共同研究者				
発表学会文献等	Ryota Gomi, Tomonari Matsuda, Masaki Yamamoto, Pei-Hsin Chou, Michio Tanaka, Satoshi Ichiyama, Minoru Yoneda, and Yasufumi Matsumura (2018) Characteristics of Carbapenemase-Producing <i>Enterobacteriaceae</i> in Wastewater Revealed by Genomic Analysis. <i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy</i> . in press			
成 果 の 概 要	<b>研究内容・研究成果・今後の見通しなどについて、簡略に、A4版・和文で作成し、添付して下さい。(タイトルは「成果の概要／報告者名」)</b>			
会 計 報 告	交付を受けた助成金額	1,000,000 円		
	使用した助成金額	1,000,000 円 (使用見込分も含む)		
	返納すべき助成金額	0 円		
	助成金の使途内訳	費 目	金 額	
		試薬・実験用消耗品	298,640	
		学会参加費	27,420	
		英文校閲料・論文掲載料	128,932	
		DNA解析ソフトサポート費用	149,040	
書籍購入代		13,240		
その他(白衣・データ保存用HDD等)	99,060			
DNA解析試薬(見込み)	283,668			
当財団の助成に つ い て	貴財団からの研究助成により、申請時の研究課題および関連テーマに関する研究を円滑に進めることができました。心より感謝申し上げます。			

## 成果の概要/五味良太

本研究では、下水処理水及び病院排水中のカルバペネム<sup>(注1)</sup>耐性腸内細菌科細菌のゲノム解析を行った。本報告書では、はじめに本研究の背景を簡単に説明し、その後成果の要約を記述することとした。

### 背景

近年、抗生物質に耐性を示す細菌 (薬剤耐性菌)が世界規模で増加している。これらの細菌により引き起こされた感染症は、治療の選択肢が限られることから、世界共通の脅威として認識されている。世界保健機関 (WHO)の報告 (Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014)によると、これらの薬剤耐性菌のうち、*Escherichia coli* (大腸菌)、*Klebsiella pneumoniae*、黄色ブドウ球菌の3種は特に重要な病原体として挙げられている。中でも大腸菌と *Klebsiella* は臨床的に重要な *Enterobacteriaceae* (腸内細菌科細菌)と呼ばれるグループに属しており、カルバペネマーゼ<sup>(注2)</sup>といった薬剤分解酵素を産生する場合もあることから、大きな問題となっている。これらの細菌がどのような経路でヒトへ取り込まれて感染を引き起こしているのか未知な部分が多いが、一つの可能性として、細菌に汚染された環境水 (河川水等)が飲用水・水浴・農業用水へと利用されることによる経路が考えられている。下水処理水や病院排水は、薬剤耐性菌が河川へと拡散する主要な原因の1つとみなされていることから、これらの排水中の薬剤耐性菌の実態 (どのような菌種が含まれているのか、どのようなカルバペネマーゼ遺伝子を保有しているのか等)を解明することが急務となっている。そこで本研究では、下水処理水および病院排水中から単離されたカルバペネム耐性腸内細菌科細菌の全ゲノム解析を行い、これらの細菌の遺伝学的特性を解明することを目的として研究を行った。

### 成果

本研究では、下水処理水および病院排水から45株のカルバペネム耐性腸内細菌科細菌を単離し、シーケンサー<sup>(注3)</sup>によってゲノム配列を決定した。その結果、これらの菌株は、*Klebsiella quasipneumoniae* (n = 12)、*Escherichia coli* (n = 10)、*Enterobacter cloacae* complex (n = 10)、*Klebsiella pneumoniae* (n = 8)、*Klebsiella variicola* (n = 2)、*Raoultella ornithinolytica* (n = 1)、*Citrobacter freundii* (n = 1)、*Citrobacter amalonaticus* (n = 1)といった菌種で構成されていることがわかった。これら45株のうち38株はカルバペネマーゼ遺伝子を保有しており、そのうち29株は、*bla*<sub>GES-5</sub>、*bla*<sub>GES-6</sub>、*bla*<sub>GES-24</sub>といった、*bla*<sub>GES</sub>タイプのカルバペネマーゼ遺伝子を保有していた。本研究で検出された *bla*<sub>GES</sub> 遺伝子は、In1439、In1440、In1441、In1442といった、新しいクラス1インテグロン<sup>(注4)</sup>中に存在していることが判明した。また、*bla*<sub>VIM-1</sub>、*bla*<sub>NDM-5</sub>、*bla*<sub>IMP-8</sub>、*bla*<sub>IMP-19</sub>、*bla*<sub>KPC-2</sub>といったカルバペネマーゼ遺伝子を保有する菌株も、少数ながら存在した。このうち *bla*<sub>IMP-8</sub> と *bla*<sub>IMP-19</sub> は、過去に臨床分離株で報告されたクラス1インテグロンと同じインテグロン (In73 および In477)中に存在することがわかった。病原遺伝子の保有パターンを調べたところ、大腸菌、*Klebsiella* とともに、高い病原性の発揮に関連していると考えられる病原遺伝子は、保有していないことがわかった。また、*Enterobacter* のうち6株は、ゲノム解析の

結果、新しい菌種に属している可能性が高いことがわかった。本研究の結果、様々なカルバペネマーゼ遺伝子を保有した様々な菌種の細菌が下水中に存在することがわかり、下水処理性能の向上や、継続した下水のモニタリングが必要であることが示唆された。また、本研究では、薬剤耐性遺伝子が存在する位置 (染色体かプラスミドか) に関しては決定できなかった。今後は、ロングリードシーケンス<sup>(注5)</sup>といった技術を用い、本研究では決定できなかった薬剤耐性遺伝子の位置に関する知見を得る必要がある。

本研究の成果は、五味を筆頭兼責任著者として、*Characteristics of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Wastewater Revealed by Genomic Analysis* というタイトルで、*American Society for Microbiology* が発行する *Antimicrobial Agents and Chemotherapy (AAC)* 誌に受理された。本研究論文は AAC 誌の Volume: 62、Issue: 5 に掲載予定である。なお、論文の Acknowledgements には、*This work was supported by The Kyoto University Foundation.* という記述がある。また、本研究で得られた成果について、サンプリングを行った下水処理場の職員へと発表・説明し、下水処理の現場へと研究成果を還元することにも試みた。今後は、国内学会への参加・発表を通して、国内研究者や事業者にも、積極的に研究成果をフィードバックしていく予定である。

関連研究の DNA 実験に関する一部の実験は、解析に必要な菌株数を確保できなかったことから、年度内に実施することができなかった。よって、一部の経費 (283,668 円) は次年度以降に使用する予定である。なお、購入試薬としては MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycles) (276,000 円) や、Nextera XT DNA Library Preparation Kit (144,000 円) を考えている。

(注 1) 抗菌薬の種類。最後の砦と呼ばれる抗菌薬の 1 つである。

(注 2) カルバペネムを分解する酵素

(注 3) 塩基配列を決定するための装置。本研究では Illumina 社の MiSeq を用いた。

(注 4) 薬剤耐性遺伝子等が存在する遺伝子カセットを取り込んだり、発現したりする能力をもった DNA の構造

(注 5) より長いリードを生成する塩基配列決定技術。近年の技術革新により可能になった。